

Paris 1969

THESE

Adaptation du virus de la stomatite vésiculaire
à Drosophila melanogaster.

ARTICLE PRINCIPAL

recouvrant en partie la thèse de Doctorat
es-Sciences Naturelles enregistrée au
C.N.R.S. sous le numéro : A.O. 3803

Pierre PRINTZ

soutenue le 19 Décembre 1969 à la Faculté
des Sciences d'Orsay, devant le Jury :

MM. Ph. L'Héritier	Président
G. Brun	Examineur
Mle D. Marcou	"
M. M. Girard	"



Centre National de la Recherche Scientifique,
Laboratoire de Génétique des Virus,
Gif-sur-Yvette, France

Propriétés du virus de la stomatite vésiculaire adapté à la Drosophile

Par

P. Printz

Avec 4 Figures

(Reçu le 9 Novembre 1968)

Introduction

Il a été montré que le virus de la stomatite vésiculaire (VSV), normalement propagé sur cellules de vertébrés, se multiplie dans la Drosophile (15) dès la première inoculation à cet insecte. Les passages successifs du virus sur ce nouvel hôte ont permis de sélectionner un variant adapté, qui a reçu le nom de VSV_D. Contrairement au virus initial qui ne provoque aucun symptôme apparent, le VSV_D, inoculé aux Drosophiles, leur confère une sensibilité particulière au gaz carbonique (18, 20), qui rappelle celle provoquée par le virus héréditaire sigma (10). Une exposition, même brève, au CO₂ entraîne la mort des Drosophiles virosées, soit après un certain délai et un réveil transitoire des mouches (sensibilité retardée), soit immédiatement sans que les mouches sortent de la narcose provoquée par le gaz (sensibilité immédiate). Ce symptôme est suffisamment régulier pour servir de base à une méthode de dosage biologique du VSV_D sur Drosophile (19).

Au cours de cette adaptation le sérotype du VSV n'a pas varié et le virus a conservé la capacité de se multiplier sur cellules de vertébrés. Les propriétés de ce variant peuvent donc être étudiées et comparées sur deux systèmes cellulaires: la Drosophile et les cultures de cellules de vertébrés. Le présent mémoire rapporte quelques résultats de cette étude.

Matériel et techniques

Les techniques d'extraction du virus, d'inoculation aux Drosophiles et de test au CO₂ ont déjà été décrites (19).

Souches virales

Le VSV_D utilisé dans les expériences présentées ci-après a subi entre 20 et 25 passages sur *Drosophiles*. Les mouches inoculées sont toujours conservées à 25°C.

Méthodes de dosage

Chez la *Drosophile*, le VSV est dosé selon la méthode précédemment décrite (19); elle consiste à inoculer à plusieurs lots de mouches des dilutions, d'une suspension virale, telles qu'elles ne provoquent la mort que d'une fraction des individus soumis au test du CO₂; ces derniers représentent alors ceux qui ont reçu une particule efficace. Le titre s'exprime en unités infectantes (UI). L'unité infectante est définie comme la quantité qui, contenue dans un volume d'injection, rend sensible une mouche avec une probabilité $1 - e^{-1} = 0.633$.

Le VSV_D peut également être titré, comme le VSV normal, sur cultures de fibroblastes d'embryons de poulet, en utilisant la méthode des plages. La technique adoptée est celle de PORTERFIELD (17). La suspension virale diluée est mise au contact du tapis cellulaire pendant 1 heure à 27°C, puis le tout est recouvert d'une solution d'agar. Le temps d'incubation du virus est de 48 heures lorsque les fibroblastes sont maintenus à 37°C et de 72 heures s'ils sont placés à 27°C. Les plages sont mises en évidence après coloration au rouge neutre. Le titre s'exprime en unités formant plages (UFP).

Résultats**1. Multiplication du VSV_D dans la *Drosophile***

Pour suivre la cinétique de multiplication du VSV_D dans la *Drosophile*, un lot de mouches a été inoculé avec une suspension virale récoltée à la suite d'un 24^e passage sur cet hôte. Le titre de l'inoculum de départ était de 750 UI par mouche. L'accumulation du virus a été suivie durant 22 jours en dosant la quantité de virus contenue dans des lots de 10 mouches (mâles et femelles) prélevées régulièrement. La récolte moyenne fournie par une *Drosophile* à des temps variables après l'infection est représentée par la Fig. 1. Cette récolte, exprimée par la valeur du logarithme du nombre d'UI, est de 1,32 4 heures après l'infection et augmente nettement à partir de la 8^e heure pour atteindre un maximum vers le 4^e jour. Avec la même unité, ce maximum est de l'ordre de 6,65 par mouche; il décroît ensuite lentement jusqu'à la mort de la mouche. Le titre fourni par le dernier prélèvement effectué le 22^e jour après l'infection ne s'élève qu'à 5,35.

2. Pathogénicité du VSV_D pour la *Drosophile*

Un effet pathogène du virus sur la *Drosophile* peut se traduire par deux modifications faciles à observer: une diminution de la longévité et un abaissement de la fertilité des femelles. Ces deux aspects de la biologie de la *Drosophile* ont donc été étudiés dans le cas des mouches infectées par le VSV_D.

a) Longévité

L'expérience qui consiste à mesurer la durée de vie de mouches virosées par rapport à des mouches sans virus est menée de la manière suivante: les lots comparés sont issus du même flacon d'élevage et le témoin reçoit une injection de liquide servant à l'extraction du virus. Deux lots témoins et deux lots virosés, chacun de 40 mouches, sont comparés. La densité des individus par flacon est suffisamment faible pour éliminer tout risque de carence alimentaire; les mouches sont repiquées sur milieu neuf tous les 2 jours. Les survivants sont dénombrés 15, 20 et 24 jours après l'inoculation. Le Tableau 1 donne un exemple des résultats obtenus à la suite d'une telle expérience.

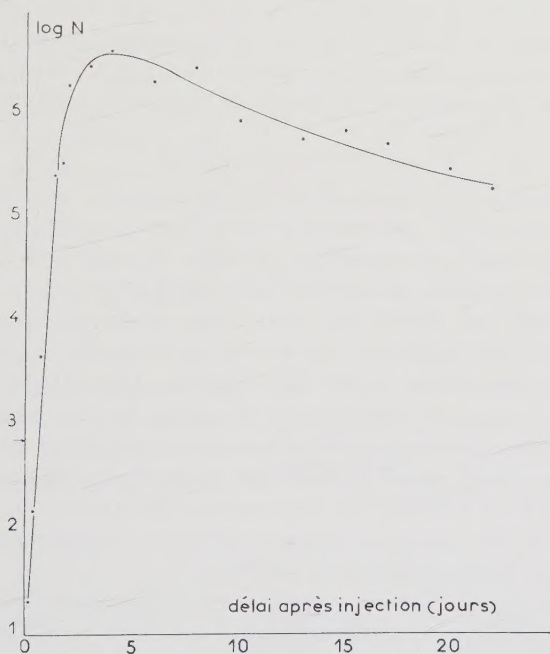


Fig. 1. Courbe d'accumulation du VSV_D après inoculation de 750 unités infectantes (UI) aux Drosophiles. N représente le nombre moyen d'UI par mouche broyée.

Tableau 1. Exemple de table de mortalité obtenue après inoculation du VSV_D aux mouches. Les chiffres représentent le % moyen de survivants des 2 lots identiques

Délai après injection	Pourcentage de survivants	
	Drosophiles sans virus	Drosophiles virosées
15 jours	90	88
20 jours	72	55
24 jours	57	10

On constate que la durée de vie des *Drosophiles* virosées est écourtée. 24 jours après l'inoculation, les lots témoins comprennent au moins 50% de survivants en bon état physiologique alors que les lots virosés ne renferment que 10% en moyenne d'individus en très mauvais état. Il est impossible de conserver ces mouches plus de 25 ou 26 jours; dans les mêmes conditions, une partie des *Drosophiles* sans virus survit couramment au-delà de 30 jours.

Lorsqu'on examine plus en détail le processus de la mortalité des *Drosophiles* virosés, on constate que dans les 15 jours qui suivent l'inoculation, aucune différence sensible n'apparaît entre celles-ci et les témoins. Ce n'est qu'ensuite que la mortalité s'accroît dans les lots virosés. Elle suit d'assez loin l'accumulation maximum du virus dans la mouche, qui, d'après la courbe, se situe dès le 5^e jour. Ceci semble signifier que la forme générale de la courbe de mortalité des *Drosophiles* n'est pas modifiée; ce que paraît faire le virus, c'est accélérer le processus normal de sénescence.

b) Fertilité des femelles

L'étude de la fertilité des femelles nécessite, comme celle de la longévité, la comparaison de lots témoins et de lots virosés. La ponte des *Drosophiles* est un mécanisme physiologique variable et sensible à de nombreux facteurs, aussi certaines précautions doivent-elles être prises. La technique employée a déjà été décrite à la suite d'une étude similaire réalisée avec le virus héréditaire sigma (9). La fertilité est mesurée en dénombrant les descendants adultes issus de lots de 6 femelles. Les extraits sont préparés à partir de *Drosophiles* sensiblement de même âge, les unes virosées, les autres sans virus. Les suspensions obtenues sont inoculées aux *Drosophiles* femelles, après leur immobilisation par le froid et non une narcose par éthérisation. Pour atténuer les fluctuations du rythme de ponte, la descendance de 2 lots de chaque catégorie est suivie régulièrement. Quelques mâles sans virus sont ajoutés aux femelles.

Les résultats de plusieurs expériences indépendantes montrent une action assez nette du virus sur la fertilité. La Fig. 2 représente l'évolution de la ponte durant les 8 jours qui suivent l'inoculation; les mouches virosées ont reçu 10^3 UI. Chacune des courbes est la moyenne des 2 lots menés parallèlement et chaque point représente la descendance adulte provenant d'une ponte de 24 heures et ramenée à 1 femelle. Comme on peut le constater, le nombre de descendants issus d'une *Drosophile* virosée baisse rapidement, la réduction est d'un facteur 4 trois jours après l'inoculation et la ponte s'annule complètement à partir du 7^e jour. Cet arrêt est définitif car les mouches ont été conservées jusqu'au 22^e jour de l'expérience et aucune reprise n'a été observée chez les *Drosophiles* virosées. L'action stérilisante du VSV_D, variable d'une expérience à l'autre et fonction de la richesse de l'inoculum, reste toujours visible.

Il faut noter que ce que l'on a mesuré est un rythme de production de descendants adultes et non un rythme de ponte. Ces deux rythmes ne sont reliés que si les œufs pondus par les femelles virosées évoluent en imagos avec la même probabilité que ceux des femelles témoins. La mesure de l'efficacité avec laquelle les œufs pondus par les deux catégories de mouches donnent des imagos, n'a pas été faite. On ne possède donc pas de preuve expérimentale directe; cependant ce facteur, même s'il intervient, est certainement minime. En effet, l'examen de l'appareil génital des femelles virosées, après dissection selon la méthode de BREGLIANO (2) révèle un état très régressé des ovaires. La photo de la Fig. 3 illustre cette observation. Elle représente les ovaires de femelles, les unes virosées, les autres sans virus, disséquées 3 jours après l'injection. La taille très réduite des ovaires des femelles virosées est due à la diminution du nombre des œufs prêts à être

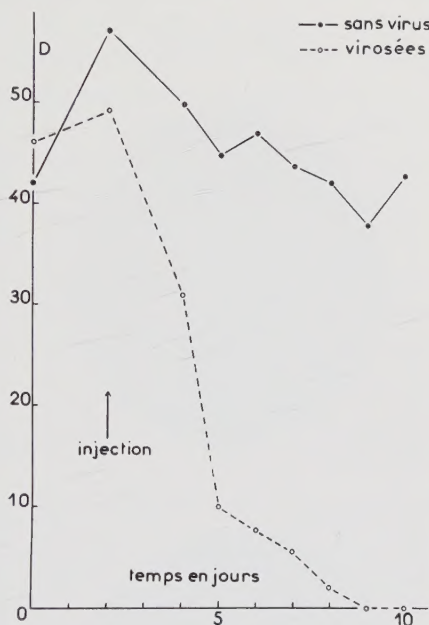


Fig. 2. Fertilité comparée de femelles sans virus et virosées. D représente le nombre de descendants adultes recueillis dans un délai de 24 heures et rapporté à une femelle. La flèche indique le jour de l'injection.

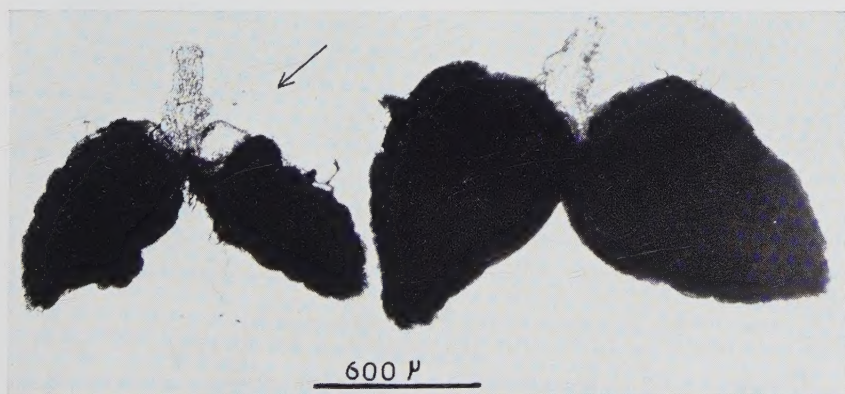


Fig. 3. Photographie d'ovaires disséqués 3 jours après l'injection. La flèche indique les ovaires d'une femelle virosée.

pondus. L'ovogénèse est donc perturbée et la diminution du rythme de ponte explique certainement à elle seule l'abaissement de la fertilité.

La recherche du virus dans les descendants de femelles virosées, soit par test au CO_2 de ceux-ci et observation de mouches sensibles, soit par broyat et recherche de plages sur fibroblastes, a toujours abouti à un résultat négatif. Aucune transmission à la descendance n'a pu encore être

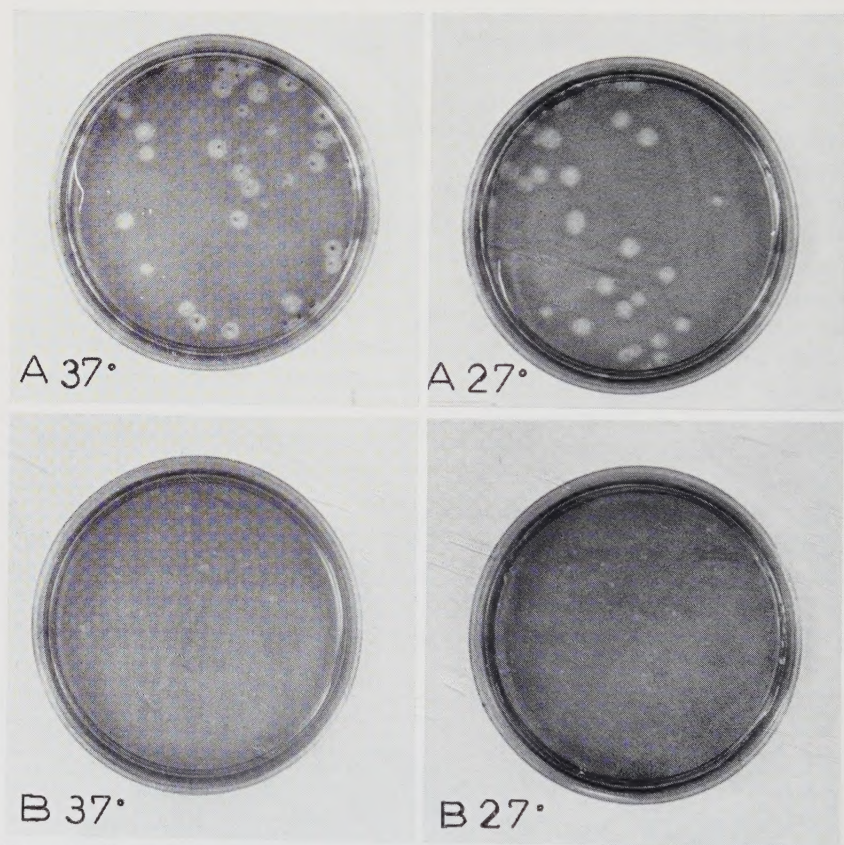


Fig. 4. Photographies de plages obtenues après 48 heures d'incubation à 37° et 72 heures à 27°. A: VSV d'origine. B: VSV_D. Boîtes de Petri de 55 mm.

détectée, même dans les cas favorables où la ponte était moins nettement ralentie. On sait qu'une telle transmission est caractéristique du virus sigma (16).

3. Propriétés du VSV_D sur fibroblastes d'embryons de poulet

Comme il a été signalé, le VSV_D a conservé un effet cytopathogène sur cellules de vertébrés. Mais les caractéristiques du VSV sur ce système cellulaire apparaissent modifiées à la suite de son adaptation à la *Droso-*

phile. Deux modifications en effet sont mises en évidence: l'une concerne la morphologie des plages, l'autre l'influence de la température sur la multiplication du virus.

a) Morphologie des plages

Le VSV de départ était un mélange des 2 variants „grandes plages“ et „petites plages“ (25); ces plages sont l'une et l'autre à contour net sur les fibroblastes d'embryons de poulet. Les plages du virus adapté à l'insecte, que l'incubation ait eu lieu à 27° ou à 37°C, présentent un aspect très différent: elles sont petites et très irrégulières. Les photos reproduites sur la Fig. 4 donnent un exemple de plage du VSV de départ et de VSV_D ayant subi 25 passages. Comme on peut le constater les différences d'aspect sont extrêmement nettes aussi bien à 27° qu'à 37°C. Notons que ceci ne résulte pas de la présence au départ des 2 variants et de la disparition des „grandes plages“; en effet, les essais récents de passages successifs de VSV réalisés à partir du variant „grandes plages“ cloné, conduisent aux mêmes résultats.

Tableau 2. Evaluation du titre viral sur fibroblastes après incubation de 48 heures à 37°C et de 72 heures à 27°C. Les titres sont rapportés à 1 *Drosophile* broyée

Extraits	Titre à 37° C	Titre à 27° C
	UFP par <i>Drosophile</i>	UFP par <i>Drosophile</i>
1	$1,91 \cdot 10^3$	$2,00 \cdot 10^5$
2	$4,21 \cdot 10^3$	$2,47 \cdot 10^5$
3	$6,20 \cdot 10^2$	$2,67 \cdot 10^5$

b) Thermosensibilité du VSV_D

Le dosage comparatif du VSV_D sur fibroblastes placés à 27° et 37°C montre que le virus se comporte comme un variant thermosensible. Le Tableau 2 regroupe les résultats de 3 dosages indépendants effectués chacun à 27° et 37°C; les extraits étaient préparés en broyant les *Drosophiles* dans 200 fois leur poids de solution d'extraction et correspondaient aux 21^e et 22^e passage sur l'hôte.

Les écarts entre les deux dosages sont très importants et on peut estimer à 100 la diminution de la probabilité de former une plage à 37°C. L'évaluation du titre d'une suspension de VSV_D doit donc se faire en plaçant les fibroblastes à 27°C.

4. Probabilité d'implantation dans les deux systèmes cellulaires

L'unité infectante définie dans le dosage biologique du virus sur *Drosophile* correspond à une particule efficace en moyenne dans l'insecte; il était donc intéressant de comparer cette dernière à l'unité formant plage.

De nombreux essais ont été réalisés dans ce but en dosant la même suspension virale sur *Drosophiles* et sur fibroblastes placés à 27°C. Les résultats obtenus ont toujours révélé une différence dans les titres fournis par les deux méthodes. Le titre évalué sur *Drosophiles* est régulièrement et significativement supérieur à celui que donne le dosage sur fibroblastes. Quelques exemples de dosages doubles* ont été rassemblés sur le Tableau 3. Les suspensions virulentes correspondent aux 22è et 23è passages sur *Drosophile*. Les titres sont exprimés en unités logarithmiques.

On peut constater que la probabilité d'implantation du VSV_D dans la *Drosophile* est supérieure par un facteur d'au moins 10 à celle de former une plage sur fibroblastes. La légère différence de température entre les deux systèmes n'intervient pas, car les quelques essais réalisés sur les *Drosophiles* à la température de 27°C fournissent des résultats semblables.

Tableau 3. Evaluation du titre d'une même suspension virale dosée sur *Drosophiles* et sur fibroblastes placés à 27°C. Les titres sont exprimés en unités logarithmiques et représentent la récolte d'une *Drosophile* broyée

Extraits	Titre sur <i>Drosophiles</i>	Titre sur fibroblastes	Différence
	UI par <i>Drosophile</i>	UFP par <i>Drosophile</i>	
1	6,70	5,30	1,40
2	6,66	5,39	1,27
3	6,45	5,43	1,02

Discussion

La multiplication du VSV_D dans la *Drosophile* présente une allure caractéristique avec maintien d'une teneur élevée en virions pendant toute la vie de l'insecte. La baisse du titre entre le rendement maximum (4è jour après l'injection du virus) et le dernier prélèvement (22è jour) n'est, en unités logarithmiques, que de 1,30. Chez un autre insecte, le moustique *Aedes aegypti*, la situation est différente (13, 23): on observe, en effet, après inoculation du VSV, une montée très rapide du titre suivie d'une diminution importante; la baisse atteint, toujours en unités logarithmiques, 1,85 en l'espace de 12 jours.

La multiplication de deux autres virus a été étudiée à la fois chez la *Drosophile* et le moustique: le virus héréditaire sigma et le virus Sindbis. Le virus sigma fournit une récolte qui, dans les deux insectes, reste pratiquement constante (16, 14). Le virus Sindbis présente une situation analogue à celle du VSV, à savoir une baisse du rendement viral beaucoup plus accentuée chez le moustique (3) que chez la *Drosophile* (7).

Le maintien d'une concentration en virions pratiquement constante durant un intervalle de temps important semble donc caractéristique de la multiplication de plusieurs virus dans la *Drosophila*. Cette situation peut correspondre à deux hypothèses différentes: soit persistance d'une récolte unique de virions produits dans les premiers jours de l'infection, soit équilibre dynamique entre la production et l'inactivation de virions. Actuellement, pour les trois virus cités, on ne dispose d'aucune preuve expérimentale directe permettant de choisir entre ces deux hypothèses.

Le VSV_D confère aux *Drosophiles* le symptôme de la sensibilité au CO₂, mais il a également un effet pathogène pour cet hôte. Ceci est assez caractéristique de ce virus. Dans le cas du virus sigma, les seuls faits signalés concernent la fertilité des femelles (9) et le taux d'éclosion des œufs pondus (22): il s'agit dans les deux cas d'effets assez minimes qui ne s'observent qu'avec des souches particulières du virus. Les souches usuelles de sigma ne paraissent provoquer aucune perturbation décelable dans les fonctions physiologiques entrant en jeu dans la vie normale de la *Drosophila*. Cette pathogénicité du VSV_D ne semble pas relever de l'aptitude à fournir une récolte abondante, car le virus Sindbis, qui se multiplie aussi bien que le VSV_D dans la *Drosophila*, ne provoque rien de semblable chez la mouche (7).

En même temps que l'adaptation du VSV à la *Drosophila*, on observe une modification du comportement du virus sur les fibroblastes d'embryons de poulet. La taille des plages est nettement diminuée et le virus se multiplie mal à 37°C. Il a déjà été signalé une évolution similaire du VSV à la suite de passages successifs de celui-ci sur les cellules BHK₂₁ placées à 25°C (24): au 10^e cycle de multiplication à 25°C, la dimension des plages est réduite et le virus est plus thermosensible que le virus de départ. Les modifications sont de moindre amplitude que celles constatées avec le VSV_D mais il faut noter que les observations sont faites après 10 passages sur BHK₂₁, alors que le nombre de passages subis par le virus dans la *Drosophila* est supérieur à 20.

On sait que les cycles de multiplication successifs à basse température conduisent couramment à l'obtention de souches virales thermosensibles; c'est le cas du poliovirus (6) et de celui de la fièvre aphteuse (21). Cette thermosensibilité est très souvent en corrélation avec une pathogénicité atténuée du virus: il en est ainsi pour le poliovirus (11), le virus de la fièvre aphteuse (1) et celui de Coxsackie (5). Les essais préliminaires réalisés dans ce but avec le VSV_D en inoculant des souris et des souris semblent indiquer une même corrélation.

La comparaison des dosages du VSV_D effectués sur *Drosophiles* et sur fibroblastes, montre que la probabilité d'implantation dans la *Drosophila* est supérieure par un facteur se situant entre 10 et 20 à celle de donner une plaque. Ceci n'est pas forcément une indication de l'adaptation de ce vari-

ant à la *Drosophile*, car les conditions de l'implantation sont très différentes dans les deux systèmes. Les numérations en microscopie électronique du VSV effectuées pour évaluer le rapport entre le nombre de particules physiquement décelables et le nombre d'unités infectieuses (UFP) ont fourni des résultats très variables selon les auteurs: ils s'étalent en effet de 1 (4) à 126 (12) en passant par 40 (8). Ces écarts semblent essentiellement dus à la multiplicité d'infection adoptée et à la préparation des extraits, plutôt qu'à des différences dans les cultures cellulaires employées pour les dosages (4). Dans le cas du VSV_D, ce rapport sur fibroblastes n'est certainement pas égal à 1, puisqu'une suspension virale paraît au moins 10 fois plus riche lorsqu'on la titre sur *Drosophile*. Une estimation de sa valeur absolue, tant sur fibroblastes que sur mouches, nécessiterait des numérations de virions au microscope électronique.

Résumé

Le VSV_D présente, sur les deux systèmes qui permettent son étude, un certain nombre de différences par rapport à la souche originelle. Les deux plus importantes sont une diminution de l'effet cytopathogène sur cellules de vertébrés et l'acquisition du pouvoir de provoquer le symptôme de la sensibilité au CO₂ chez les *Drosophiles* infectées. Cette réaction était considérée jusqu'à présent comme spécifique du virus héréditaire sigma; aussi présente-t-elle un intérêt certain pour le rapprochement établi entre ces deux virus, rapprochement basé au départ sur la simple ressemblance morphologique des virions.

Le VSV_D provient de passages successifs sur *Drosophiles*; il est donc certain que se produit au cours de ceux-ci une évolution de la population virale. Selon toute vraisemblance, celle-ci doit résulter d'une sélection de mutants mieux adaptés à l'insecte. On peut alors se demander si cette adaptation fait intervenir un grand nombre de mutations d'effet faible, ou si, au contraire, elle ne comporte qu'un petit nombre d'étapes majeures que l'on pourrait alors mettre en évidence en étudiant des clones isolés à l'issue des différents passages. Des expériences sont actuellement entreprises dans ce but.

Summary

Some properties of the vesicular stomatitis virus adapted to *Drosophila* (VSV_D) are described. The growth of VSV_D in flies results in a yield of virus which diminishes slowly during the lifetime of the host. VSV_D exerts a dual pathogenic effect on *Drosophila*: it reduces the longevity of flies as well as the fertility of femals. On propagation of VSV_D in chick fibroblast monolayers the virus proved to be a temperature sensitive variant of VSV: in contrast to propagation at 27°C the virus grows poorly and the size of plaques is reduced at 37°C. Furthermore, the efficiency of infection is higher by a factor of about 10 in flies than in chick fibroblast cultures.

Bibliographie

1. ASSO, J., J. M. AYNAUD et M. F. PLART: Etude de mutants du virus aphteux obtenus par culture à basse température. *Ann. Inst. Pasteur* **110**, 233—243 (1966).
2. BREGLIANO, J. C.: Etude de la quantité de virus sigma infectieux contenu dans les cystes ovariens de *Drosophiles* stabilisées et inoculées. *Ann. Inst. Pasteur* **109**, 638—651 (1965).
3. ECHALIER, G.: Multiplication d'un Arbovirus, Sindbis, dans le corps d'un vecteur expérimental, le Moustique *Aedes aegypti* (L.). *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **261**, 1920—1922 (1965).
4. GALASSO, G.: Quantitative studies on the quality, effects of aggregation and thermal inactivation of vesicular stomatitis virus. *Arch. ges. Virusforsch.* **21**, 437—446 (1967).
5. GEVAUDAN, P., J. CHARREL et G. PIERONI: Recherche sur un variant „froid“ de virus Cocksackie. *Ann. Inst. Pasteur* **114**, 209—215 (1968).
6. GROMAN, N., A. LWOFF et M. LWOFF: Recherche sur un variant dit „froid“ du virus de la poliomyélite. *Ann. Inst. Pasteur* **98**, 351—359 (1960).
7. HERRENG, F.: Etude de la multiplication de l'Arbovirus Sindbis chez la *Drosophile*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **264**, 2854—2857 (1967).
8. HOWATSON, A., and G. WHITMORE: The development and structure of vesicular stomatitis virus. *Virology* **16**, 466—478 (1962).
9. JUPIN, N., N. PLUS et A. FLEURIET: Action d'une souche de virus sigma sur la fertilité des *Drosophiles* femelles. *Ann. Inst. Pasteur* **114**, 577—594 (1968).
10. L'HÉRITIER, PH.: The hereditary virus of *Drosophila*. *Advanc. Virus Res.* **5**, 195—245 (1958).
11. LWOFF, A., et M. LWOFF: Sur les facteurs du développement viral et leur rôle dans l'évolution de l'infection. *Ann. Inst. Pasteur* **98**, 173—203 (1960).
12. MCCOMBS, R., M. BENIESH-MELNICK, and J. BRUNSCHWIG: Biophysical studies of vesicular stomatitis virus. *J. Baet.* **91**, 803—812 (1966).
13. MUSSGAY, M., and O. SUAREZ: Multiplication of vesicular stomatitis virus in *Aedes aegypti* (L.) mosquitoes. *Virology* **17**, 202—204 (1962).
14. OHANESSIAN, A., et G. ECHALIER: Multiplication du virus héréditaire de la *Drosophile* dans le Moustique *Aedes aegypti* (L.). IX^e Int. Congr. Microbiol. 476 (1966).
15. PERIÈS, J., P. PRINTZ, M. CANIVET et J. C. CHUAT: Multiplication du virus de la stomatite vésiculaire chez *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **262**, 2106—2107 (1966).
16. PLUS, N.: Etude de la multiplication du virus de la sensibilité au gaz carbonique chez la *Drosophile*. *Bull. Biol. franç. belge* **88**, 248—293 (1954).
17. PORTERFIELD, J. S.: A simple plaque-inhibition test for the study of arthropod-borne viruses. *Bull. Wld Hlth Org.* **22**, 373—380 (1960).
18. PRINTZ, P.: Mise en évidence d'un variant du virus de la stomatite vésiculaire (souche Indiana) conférant une sensibilité retardée au gaz carbonique chez *Drosophila melanogaster*. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **265**, 169—172 (1967).
19. PRINTZ, P.: Mise au point d'une technique de dosage sur *Drosophile* du virus de la stomatite vésiculaire adapté à cet insecte. *Ann. Inst. Pasteur* **114**, 669—679 (1968).

20. PRINTZ, P.: Modification du symptôme de la sensibilité au gaz carbonique conféré aux *Drosophiles* par le virus de la stomatite vésiculaire adapté à cet insecte. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* **162**, 372—373 (1968).
21. PRUNET, P.: Modification du comportement du virus aphteux lors des passages successifs en culture de tissu à diverses températures: recherche de mutants „froids“. *Ann. Inst. Pasteur* **106**, 18—28 (1964).
22. SEECOF, R.: Deleterious effects on *Drosophila* development associated with the sigma virus infection. *Virology* **22**, 142—148 (1964).
23. SUAREZ, O.: Multiplication y transmission del virus stomatitis vesicular por *Aedes aegypti*. *Acta Cient. venez.* **3**, 387—394 (1967).
24. THORMAR, H.: A comparison of coccal and vesicular stomatitis virus, serotypes New Jersey and Indiana. *Virology* **31**, 323—328 (1967).
25. WAGNER, R., A. LEVY, and R. SNYDER: Biologic properties of two plaques variants of vesicular stomatitis virus (Indiana serotype). *J. Immunol.* **91**, 112—122 (1963).

Adresse de l'auteur: Dr. P. PRINTZ, Centre National de la Recherche Scientifique. Laboratoire de Génétique des Virus, F-91 Gif-sur-Yvette, France.

